

# 外泌体作为诊断结核分枝杆菌感染的标志物研究

王楠<sup>1</sup>, 吴建红<sup>1</sup>, 李玉洁<sup>1</sup>, 郑志焕<sup>2</sup>, 姚丽洪<sup>3</sup>, 王建军<sup>1\*</sup>

(1. 江苏大学附属昆山医院 检验科, 中国江苏 昆山 215300; 2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院) 临床与基础医学院, 中国山东 济南 250000; 3. 长春市疾病预防控制中心, 中国吉林 长春 130000)

**摘要:** 外泌体(exosome)是一种直径为 30~150 nm 的囊泡状物质,其通过携带脂质、蛋白质、mRNA 和非编码 RNA 等多种生物活性物质在机体的免疫调节过程以及细胞间的信息传递发挥至关重要的作用。近年来,越来越多的研究发现外泌体积极地参与了结核分枝杆菌感染的发生与发展。外泌体成分作为结核病感染的潜在标志物,拥有特异性强、稳定性好等特点,在结核病的诊断、疗效评估、预后监测中发挥重要的作用。本文针对外泌体作为结核病诊断标志物的价值,及在结核病中的潜在作用进行综述,为其作为诊断标志物提供理论基础。

**关键词:** 外泌体; 结核分枝杆菌; 标志物; 诊断

中图分类号: Q25, R52

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)01-0033-08

## Exosomes as Potential Markers for Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection

WANG Nan<sup>1</sup>, WU Jianhong<sup>1</sup>, LI Yujie<sup>1</sup>, ZHENG Zhihuan<sup>2</sup>, YAO Lihong<sup>3</sup>,  
WANG Jianjun<sup>1\*</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu, China; 2. College of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, Shandong, China; 3. Changchun Center for Disease Control and Prevention, Changchun 130000, Jilin, China)

**Abstract:** Exosomes are vesicular structures with a diameter of 30~150 nm, and play critical roles in immune regulation and intercellular communication by carrying various bioactive substances such as lipids, proteins, mRNAs, and non-coding RNAs. In recent years, accumulating studies have revealed that exosomes actively participate in the occurrence and development of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Moreover, exosomal components, as potential biomarkers of *M. tuberculosis* infection, have the characteristics of strong specificity and good stability, and play an important role in diagnosis, therapeutic efficacy evaluation, and prognosis of tuberculosis. Herein, the values of exosomes as diagnostic markers and their potential roles in tuberculosis are reviewed, aiming to provide a theoretical basis for their application as diagnostic biomarkers.

**Key words:** exosome; *Mycobacterium tuberculosis*; biomarker; diagnosis

(*Life Science Research*, 2024, 28(1): 033-040)

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)感染引起的结核病(tuberculosis, TB)是严重威胁人类健康的呼吸道传染病之一。据世界卫生组织估计,全世界约四分之一的人口患有结核病<sup>[1]</sup>。我国是结核病高负担国家,发病率位于全球第 3 位,占全球总结核病例的 7.4%<sup>[1]</sup>。尽管肺部是结核分

枝杆菌感染最常见的部位,但结核分枝杆菌也可以通过淋巴与血液系统感染其他脏器,导致肺外结核<sup>[2]</sup>。含有结核分枝杆菌的气溶胶颗粒进入人体气道后,首先被肺泡巨噬细胞和树突状细胞等先天性免疫细胞的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别,如 Toll 样受体(Toll-like re-

收稿日期: 2023-04-07; 修回日期: 2023-07-27; 网络首发日期: 2023-11-01

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(82002111)

作者简介: 王楠(2000—),女,江苏连云港人,硕士研究生;\*通信作者: 王建军(1986—),男,江苏南通人,江苏大学附属昆山医院副主任医师,硕士生导师,主要从事外泌体免疫机制研究, E-mail: wangjianjun0520@163.com。

ceptor, TLR)、NOD 样受体[nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor, NLR]、C 型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR)等<sup>[3-4]</sup>, 进而激活免疫细胞。活化的巨噬细胞可以通过吞噬后利用胞内溶酶体的酶解作用、生成抗菌肽等多种机制杀死结核分枝杆菌<sup>[5]</sup>。同时, 作为抗原呈递细胞, 巨噬细胞和树突状细胞将结核分枝杆菌的抗原呈递给 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞, 诱导适应性免疫应答<sup>[6]</sup>。大量免疫细胞在感染部位聚集, 形成肉芽肿, 以抑制结核分枝杆菌的扩散<sup>[7]</sup>。然而, 结核分枝杆菌具有复杂的免疫逃逸机制, 在一定程度上可以规避宿主的先天性和获得性免疫反应, 比如抑制氧化应激反应和反应性氧中间产物的生成<sup>[8]</sup>、干扰免疫细胞对结核分枝杆菌抗原的识别和呈递<sup>[9]</sup>等。另外, 结核分枝杆菌特有的蛋白质及细胞壁成分有助于结核分枝杆菌从吞噬体中逃脱或阻止吞噬体成熟<sup>[10-11]</sup>。这些免疫逃逸机制导致结核分枝杆菌持续性感染并使结核病呈慢性进展。结核分枝杆菌可以持续存活于机体内, 且不表现出典型的临床症状, 这种状态称为潜伏性结核病感染(latent tuberculosis infection, LTBI)。当机体免疫力低下时, 5%~10%的 LTBI 患者可能会进展为活动性结核(active tuberculosis, ATB)<sup>[12]</sup>, 这给结核病的预防与控制带来了巨大的挑战。

近年来, 结核分枝杆菌的耐药性情况日趋严峻, 使结核病治疗变得更加困难与棘手<sup>[13]</sup>。早发现、早诊断、早治疗对结核病防治至关重要。目前, 结核病诊断的常规方法有很多, 包括痰涂片法、结核分枝杆菌培养、影像学检查、结核菌素试验、核酸检测技术等, 但单一方法对结核病的诊断结果并不理想, 其往往需要多种检测方法联合使用才能确诊<sup>[14]</sup>。因此, 临床对可以诊断结核病的高特异性、高灵敏度的生物标志物具有迫切需求。外泌体(exosome)因携带丰富的生物活性分子、来源广泛、易于在体液中获取且稳定存在等优势而逐渐受到关注。其在众多疾病的早期诊断、疗效评估和预后监测等方面具有广阔的应用前景<sup>[15]</sup>。本文以外泌体作为结核分枝杆菌感染的潜在生物标志物为切入点, 对外泌体中的蛋白质及核酸在结核病中的应用现状及临床价值进行分析, 为其在结核病中的诊断应用提供理论基础。

## 1 外泌体的生物学特性

外泌体是一类直径 30~150 nm 的具有双层

脂质膜的纳米级囊泡, 富含脂质、蛋白质、核酸等多种生物分子, 可由多种类型的细胞(树突状细胞、巨噬细胞、癌细胞和间充质干细胞等)分泌, 并广泛存在于各种体液(血液、尿液、唾液、母乳、脑脊液、胸腔积液等)中<sup>[16]</sup>。外泌体是细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)的一种, 其形成过程可以分成 3 种途径: 1) 早期内体(early endosome)向内出芽萌发腔内囊泡(intraluminal vesicle, ILV)并成熟为多泡体(multivesicular body, MVB), 生成的多泡体既可以被溶酶体降解, 也可以与质膜融合释放外泌体<sup>[17]</sup>; 2) 质膜表面直接出芽形成外泌体<sup>[18]</sup>; 3) 细胞内膜连接间隙(intracellular plasma membrane-connected compartment, IPMC)与细胞外环境相连接, IPMC 中的囊泡通过出芽产生外泌体<sup>[19]</sup>。外泌体形成过程受到细胞多种功能蛋白质和脂质的调控。外泌体分泌到细胞外环境受 Rab-GTPase 家族蛋白如 Rab2b、Rab5a、Rab7、Rab9a、27a/b 等的调控<sup>[18, 20]</sup>。最初, 外泌体被认为是细胞排出废物的“垃圾袋”, 随着研究不断深入, 人们发现, 外泌体不仅能够充当细胞间传递信号的介质, 而且参与机体免疫调节过程。

## 2 外泌体在结核分枝杆菌感染中的作用

外泌体作为一种具有生物活性的微囊泡, 在结核分枝杆菌感染过程中扮演重要角色, 其与结核分枝杆菌之间的相互作用已经成为当下研究热点之一。结核分枝杆菌在利用外泌体作为载体传递毒性因子、调节宿主免疫反应等过程中影响结核分枝杆菌感染的发生与进展。结核分枝杆菌感染机体后, 巨噬细胞将含有病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)如结核分枝杆菌脂质、RNA 的外泌体释放到细胞外<sup>[21]</sup>, 从而诱导先天性免疫细胞 PRR 的识别, 引起更强烈的免疫反应<sup>[22]</sup>; 外泌体还携带有 CC 趋化因子配体 5 (C-C motif chemokine ligand 5, RANTES)和巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$  等趋化因子, 从而招募未受感染的巨噬细胞参与杀灭病原体<sup>[23]</sup>。此外, 间充质干细胞衍生的外泌体富含脂阿拉伯甘露聚糖和 19-kD 脂蛋白等, 其诱导巨噬细胞的 TLR2 和 TLR4 识别 PAMP, 从而激活 MyD88 依赖性信号转导途径, 促进肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、RANTES 和一氧化氮合酶的表达, 进而诱导巨噬细胞的炎症反应<sup>[24]</sup>。受结核分枝杆菌感染的上皮细胞来源的外泌体同样通过 TLR

激活 MyD88 依赖性途径,从而活化核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), 诱导巨噬细胞释放多种炎症介质和细胞因子, 增强机体防御能力<sup>[25]</sup>。结核分枝杆菌感染期间产生的外泌体是细胞外抗原的重要来源, 可增强 T 淋巴细胞诱导的适应性免疫反应<sup>[26]</sup>。树突状细胞分泌含有主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I 类分子的外泌体, 其可刺激其他幼稚树突状细胞成熟并激活 CD8+T 淋巴细胞<sup>[27]</sup>, 而巨噬细胞释放含有 MHC-II 类分子的外泌体, 该类外泌体通过将抗原信息提呈给 T 淋巴细胞参与特异性免疫<sup>[28]</sup>。

结核分枝杆菌为确保其在宿主细胞中的生存和繁殖, 具有逃避宿主免疫监视的能力。研究发现, 外泌体作为结核分枝杆菌 PAMP 的载体, 既能促进机体免疫系统的监视与清除能力, 又能抑制感染细胞以外的免疫反应。经结核分枝杆菌甘露糖糖帽修饰的脂阿拉伯甘露聚糖与肥大细胞表面的 TLR2 结合后, 肥大细胞释放的外泌体含有较高水平的 CC 趋化因子配体 2、白细胞介素(interleukin, IL)-4 和 IL-13, 可促进巨噬细胞向 M2 型极化, 从而使结核分枝杆菌逃避免疫清除<sup>[29]</sup>。另外, 感染结核分枝杆菌的细胞释放的外泌体含有 19-kD 脂蛋白和肽聚糖, 可以部分抑制巨噬细胞对  $\gamma$  干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )的反应及 MHC-II 类分子的表达<sup>[30]</sup>。因此, 外泌体在机体抗结核分枝杆菌感染的过程中发挥双重作用, 一方面它可以通过提呈抗原、识别病原体 PAMP 来诱导先天性与获得性免疫; 另一方面, 外泌体也可以通过传递毒性因子促进病原体的增殖、扩散及感染。

### 3 外泌体非编码 RNA 可作为结核分枝杆菌感染的标志物

#### 3.1 外泌体微 RNA

微 RNA (microRNA, miRNA)是长 18~22 个核苷酸的内源性非编码 RNA。成熟的 miRNA 整合在含 miRNA 诱导沉默复合物的 Argonaute 蛋白中, 通过碱基配对与 mRNA 的 3'端未翻译区域或开放阅读框区域互补结合, 从而抑制目的基因表达<sup>[31-33]</sup>。供体细胞可引导细胞内特定的 miRNA 进入外泌体的分选系统<sup>[34]</sup>, 从而使外泌体 miRNA 成为细胞间通信的关键组成部分。近期研究表明, 外泌体 miRNA 是结核分枝杆菌感染过程中的重要免疫调节剂。外泌体将 miR-20b-5p 传递至结核分枝杆菌感染的巨噬细胞, 抑制结核分枝杆菌

感染的巨噬细胞中的 miR-20b-5p 表达, 并且 miR-20b-5p 还可以抑制受体细胞凋亡, 促进巨噬细胞内结核分枝杆菌的存活<sup>[35]</sup>。结核分枝杆菌还可诱导 miR-18a 在巨噬细胞及其释放的外泌体中过度表达, 从而抑制细胞自噬, 促进巨噬细胞中结核分枝杆菌的存活<sup>[36]</sup>。有趣的是, 部分外泌体 miRNA 也可以抑制结核分枝杆菌在宿主细胞内的生长, miR-21-3p 在结核分枝杆菌感染的巨噬细胞内表达上调, 并通过促进 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达, 抑制结核分枝杆菌在胞内存活<sup>[37]</sup>。

外泌体 miRNA 在结核分枝杆菌感染细胞或人体中的表达差异与宿主的生理状态、疾病进程乃至预后均密切相关(表 1)。外泌体 miRNA 丰富的多样性使其具有成为结核分枝杆菌感染诊断标志物的可能。同时, 外泌体 miRNA 在体液中的稳定性好, 较于活检更容易收集, 因此被认为是最有前景的候选生物标志物<sup>[38]</sup>。Kaushik 等<sup>[39]</sup>发现, 结核病患者血浆中外泌体 miR-185-5p 的表达水平显著提高, 其诊断结核分枝杆菌感染的灵敏度和特异性分别为 50% 和 93.75%, 提示外泌体 miR-185-5p 可作为结核病诊断的潜在标志物。冯真等<sup>[40]</sup>研究发现, 结核病患者血浆外泌体的 miR-26a-5p 表达水平降低, miR-151a-3p 表达水平升高, 且两者在临床上对结核病具有较高的诊断效率。Alipoor 等<sup>[41]</sup>发现, miR-484、miR-425 和 miR-96 在结核病患者血清中的表达显著增加, 且与痰涂片联合检测能够提高结核病的检出率。Lyu 等<sup>[42]</sup>分析比较了 LTBI 与 ATB 患者的血清外泌体 miRNA 表达谱, 发现与健康人群相比, LTBI 患者血清中 miR-146b-5p 显著上调而 miR-381-3p 明显下调, miR-629-5p 在 ATB 患者血清中显著上调<sup>[42]</sup>。值得注意的是, 部分 miRNA (miR-140-3p、miR-423-3p、miR-3184-5p)在健康人群、LTBI 和 ATB 患者血清中表现出不同程度的上调<sup>[42]</sup>, 提示 miRNA 在结核分枝杆菌感染的不同状态下存在特异表达谱, 这为 LTBI 和 ATB 的鉴别诊断及结核病进展的诊断提供了重要手段。

外泌体 miRNA 也有助于区分结核病与其他相关疾病。Lin 等<sup>[43]</sup>运用高通量测序的方法对肺炎、肺结核和肺癌患者胸腔积液的外泌体 miRNA 进行了分析, 结果表明 miR-378i 在肺结核组的表达显著升高, 而 miR-205-5p 和 miR-200b 在肺癌组显著升高。Zhang 等<sup>[44]</sup>研究发现, 与结核性胸腔积液相比, miR-200b-3p、miR-182-5p 和 miR-

629-5p 在恶性胸腔积液中上调, 而 hsa-miR-150-5p 和 hsa-miR-3614-5p 在恶性胸腔积液中下调。尹慧敏等<sup>[45]</sup>通过对结核性脑膜炎患者、病毒性脑膜炎患者、化脓性脑膜炎患者以及正常人群脑脊液中的外泌体 let-7d 进行比较, 发现 let-7d 在结核性脑膜炎患者脑脊液外泌体中的表达明显减少, 提示外泌体 let-7d 低表达可作为结核性脑膜炎诊断与鉴别的一个潜在指标。

总之, miRNA 不仅在结核分枝杆菌感染过程中和机体免疫调节中扮演重要角色, 而且其在感染中巨大的差异表达为结核分枝杆菌感染标志物的开发提供了数据库。外泌体 miRNA 为结核病的诊断提供了新的视角。

### 3.2 外泌体环状 RNA

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是存在于所有真核细胞中呈环状结构的内源性非编码 RNA。circRNA 具有调节目基因转录、翻译、剪接以及 miRNA 海绵和编码蛋白质的功能<sup>[46]</sup>。circRNA 内的多个 miRNA 结合位点即 miRNA 海绵, 与内源性 RNA 竞争性结合, 间接调控 miRNA 靶基因表达<sup>[47-49]</sup>。circRNA 可与 MVB 融合后被供体细胞传递至外泌体中释放<sup>[50]</sup>。目前, 大量研究发现结核分枝杆菌感染宿主细胞后, 细胞发生一系列的生理与病理变化, 导致宿主细胞分泌的外泌体 circRNA 种类及表达水平差异巨大(表 1); 而且, 外泌体 circRNA 在体液中同样具有稳定性好、丰度高等突出优点<sup>[51]</sup>。因此, circRNA 同样被认为是诊断各种疾病的潜在生物标志物。

Zhang 等<sup>[52]</sup>通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 检测了 20

名结核病患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) circRNA 的表达, 发现 circ\_0028883 表达显著上调, 并推测 circ\_0028883 可能是诊断活动性肺结核的候选生物标志物。Huang 等<sup>[53]</sup>研究发现, 与健康对照组相比, 结核病患者 PBMC 中 circRNA\_001937、circRNA\_009024 和 circRNA\_005086 的表达显著升高, circRNA\_102101、circRNA\_104964 和 circRNA\_104296 的表达显著降低; 而与肺炎、慢性阻塞性肺病和肺癌患者相比, 结核患者的 circRNA\_001937 表达显著增加。更有意思的是, circRNA\_001937 在结核病治疗期间的表达显著下降, 提示 circRNA\_001937 不仅可以用于结核病及相关疾病的鉴别诊断, 而且与结核病的治疗与预后密切相关。Liu 等<sup>[54]</sup>研究表明, 结核病患者血清中 circRNA\_051239、circRNA\_029965 和 circRNA\_404022 的表达显著上调, 尤其是 circRNA\_051239 在耐药结核病患者血清中明显上调, 该研究通过分析外泌体 circRNA 协助临床鉴别了耐药性结核分枝杆菌。

现有研究表明, 结核病患者外周血外泌体富含种类丰富的 circRNA, 且供体细胞中 miRNA 的表达调控外泌体 circRNA 组成, 并将相关分子信息传递给受体细胞<sup>[55]</sup>。然而, 目前仍缺乏外泌体 circRNA 在结核病早期诊断以及与其他类似疾病鉴别诊断方面的研究。外泌体 circRNA 及其相应的线性 mRNA 序列存在部分重叠, 导致 circRNA 在体内精准的表达无法被准确评估<sup>[56]</sup>。因而, 将外泌体 circRNA 作为结核分枝杆菌感染的一种无创性诊断手段仍需要克服众多的挑战与困难。

表 1 结核分枝杆菌感染后细胞来源的外泌体 miRNA 及 circRNA 变化

Table 1 Changes of miRNAs and circRNAs in exosomes released from cells of *M. tuberculosis* infected subjects

Number	miRNA or circRNA	Sample	Screening method	Expression pattern	Reference
1	miR-185-5p	Blood plasma	ncRNA sequencing	Increase	[39]
2	miR-26a-5p	Blood plasma	qRT-PCR	Decrease	[40]
3	miR-151a-3p	Blood plasma	qRT-PCR	Increase	[40]
4	miR-484, miR-425, miR-96	Serum	qRT-PCR	Increase	[41]
5	miR-629-5p, miR-140-3p, miR-423-3p, miR-3184-5p	Serum	qRT-PCR	Increase	[42]
6	miR-378i	Pleural effusions	High-throughput sequencing	Increase	[43]
7	let-7d	Cerebrospinal fluid	qRT-PCR	Decrease	[45]
8	circ_0028883	PBMCs	qRT-PCR	Increase	[52]
9	circRNA_001937, circRNA_009024, circRNA_005086	PBMCs	qRT-PCR	Increase	[53]
10	circRNA_102101, circRNA_104964, circRNA_104296	PBMCs	qRT-PCR	Decrease	[53]
11	circRNA_051239, circRNA_029965, circRNA_404022	Serum	qRT-PCR	Increase	[54]

## 4 外泌体蛋白质可作为结核分枝杆菌感染的诊断标志物

### 4.1 外泌体结核分枝杆菌抗原

结核分枝杆菌的抗原成分极为复杂且分布广泛,可存在于血液、脑脊液、尿液、痰液、穿刺组织和结核肉芽肿中<sup>[57]</sup>。因抗原检测技术具有操作简便、快速、适用性广等优势,结核分枝杆菌抗原在结核病的免疫诊断方面具有较高的应用前景,因而吸引了众多的研究者关注。

Kruh-Garcia 等<sup>[58]</sup>在结核病患者血清外泌体中发现了 33 种结核分枝杆菌感染相关的蛋白质,包括 Ag85B (antigen 85B)、Ag85C (antigen 85C)、Apa 蛋白、BfrB 蛋白、KatG 蛋白、MPT64 蛋白等。Ag85B 可强烈诱导 Th1 型细胞免疫和体液免疫,并可能参与结核分枝杆菌的早期感染。黄佳玲等<sup>[59]</sup>研究发现,用野生型结核杆菌 H37Rv 感染小鼠 40 d 后,在感染早期阶段小鼠的细胞免疫应答显著增强,提示结核分枝杆菌感染引发的细胞免疫应答反应参与早期的感染。GlcB 是结核分枝杆菌的黏附素之一,协助结核分枝杆菌与宿主细胞受体结合。巨噬细胞受结核分枝杆菌感染后分泌的外泌体中携带 GlcB 蛋白,表明外泌体在结核分枝杆菌感染的免疫过程中发挥信息传递作用<sup>[60]</sup>。在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)伴 LTBI 患者中,利用结核病患者对 GlcB 有 Th1 特异性免疫反应,通过抗原检测可诊断 RA 患者中的 LTBI<sup>[61]</sup>。MPT64 蛋白作为一种分泌蛋白在 ATB 患者的血清和痰液中水平很高<sup>[62]</sup>。屈蓉等<sup>[63]</sup>发现,结核病患者血清中 MPT64 抗原特异性 IgG 和 IgA 的水平均显著高于健康人群,且重组 MPT64 蛋白具有较好的血清学诊断效能,表明 MPT64 蛋白可作为结核病血清学早期诊断的候选抗原之一。基于以上的研究我们不难发现,外泌体中的一些抗原成分也可以作为结核分枝杆菌感染的诊断标志物。

### 4.2 外泌体热休克蛋白

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是高度保守的蛋白质超家族,存在于所有生物体中。正常生理条件下其在细胞的表达水平较低,但当机体受到某些理化或生物因素刺激时,其表达量显著升高。根据蛋白质相对分子质量的大小,热休克蛋白被分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子热休克蛋白。

HSP16.3 属于小分子热休克蛋白,具有很强

的自发折叠和组装能力,由结核分枝杆菌的 *HSPX* 基因编码,是结核分枝杆菌免疫原性最强的抗原<sup>[64]</sup>。在结核分枝杆菌感染的潜伏期, HSP16.3 对结核分枝杆菌的生长和存活发挥重要作用,其可能会干扰巨噬细胞启动自噬,影响正常巨噬细胞的功能,从而调控巨噬细胞中结核分枝杆菌的生存<sup>[65]</sup>。Zhang 等<sup>[66]</sup>发现, HSP16.3 与巨噬细胞的相互作用取决于趋化因子受体 CCRL2 和 CX3CR1 的调控,趋化因子受体可诱导巨噬细胞创造抑制性微环境,从而促进结核分枝杆菌在细胞内的生长和潜伏。HSP16.3 在诊断结核病方面也有一定的临床价值。Zhang 等<sup>[67]</sup>通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测了结核分枝杆菌的分泌蛋白 ESAT6、CFP10、Ag85B、HSP16.3 和融合蛋白 Ag85B-HSP16.3,并评估了这些蛋白质的不同组合在 ATB 患者和 LTBI 患者间的诊断作用。血浆外泌体中含量丰富的 HSP16.3 容易被检测到,提示外泌体 HSP16.3 可作为结核分枝杆菌感染的潜在标志物。

Huang 等<sup>[68]</sup>分离了 LTBI 患者与 ATB 患者的血浆外泌体,发现 ATB 患者血浆外泌体中的 HSP16.3 蛋白异常增多,这表明 HSP16.3 蛋白可能是区分 ATB 和 LTBI 的潜在生物标志物。Shekhawat 等<sup>[69]</sup>研究发现,结核病患者血清中 HSP25、HSP60、HSP70 和 HSP90 的水平显著升高,是潜在的结核分枝杆菌感染的诊断标志物。Diaz 等<sup>[70]</sup>使用串联质谱法评估了结核分枝杆菌感染和未感染 THP-1 衍生巨噬细胞外泌体的蛋白质组成,发现 HSP90 在受结核分枝杆菌感染的巨噬细胞外泌体中显著升高。李焯等<sup>[71]</sup>研究表明,结核分枝杆菌感染后血浆中 HSP90 亚型 HSP90 $\alpha$  表达上调,且 HSP90 $\alpha$  在 ATB 患者体内的表达水平高于 LTBI 患者,同时受试者操作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线分析表明, HSP90 $\alpha$  定量检测在区分 ATB 和 LTBI 患者上具有较高的灵敏度和特异性。以上研究提示,宿主和结核分枝杆菌的热休克蛋白可能参与结核分枝杆菌的进展,外泌体热休克蛋白作为结核病的诊断标志物在临床上具有重要的应用价值。

### 4.3 外泌体其他蛋白质

外泌体富含不同类型的蛋白质,它们可分为非特异性蛋白质和特异性蛋白质。非特异性蛋白质主要来源于亲代细胞中保守区域的细胞质和膜蛋白,如热休克蛋白、黏附蛋白、跨膜蛋白、核糖

表 2 结核分枝杆菌感染后细胞来源的外泌体蛋白质变化  
Table 2 Changes of exosomal proteins from cells of *M. tuberculosis* infected subjects

Number	Protein	Sample	Screening method	Expression pattern	Reference
1	HSP16.3	Blood plasma	ELISA	Increase	[67]
2	HSP25, HSP60, HSP70, HSP90	Serum	ELISA	Increase	[69]
3	HSP90	Macrophages	Tandem mass spectrometry	Increase	[70]
4	HSP90 $\alpha$	Blood plasma	Quantitative test kit	Increase	[71]
5	MHC- I, CD36	Serum	ELISA	Decrease	[72]
6	LBP	Serum	ELISA	Increase	[72]
7	GlnA1	Serum	Multiple reaction monitoring mass spectrometry (MRM-MS)	Increase	[73]
8	C4BPA, S100A9	Plasma	Label-free MRM-MS	Decrease	[74]

体蛋白等。在不同病原体感染状态下, 宿主细胞释放的外泌体成分大相径庭(表 2), 因此, 外泌体差异蛋白质具备成为诊断结核分枝杆菌感染的生物标志物的潜力。

Zhang 等<sup>[72]</sup>通过 ELISA 实验表明, 正常人和 ATB 患者血清中的外泌体蛋白质 MHC- I、CD36 和脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)的表达存在差异。在 ATB 患者中, MHC- I 和 CD36 的表达水平降低, 而 LBP 的表达明显升高, 这 3 个蛋白质具有较高的特异性与灵敏度, 提示 MHC- I、CD36 和 LBP 可能是诊断 ATB 的潜在生物标志物。Mehaffy 等<sup>[73]</sup>对 LTBI 患者血清 EV 中的结核分枝杆菌肽进行了鉴定, 在 LTBI 患者血清中发现了谷氨酰胺合成酶(GlnA1)的单肽, 揭示了参与氮代谢的 GlnA1 可能是检测 LTBI 的病原体特异性生物标志物的候选物。另有研究发现, 在 LTBI 患者治疗后的血浆外泌体中, C4BPA 和 S100A9 的表达明显下降<sup>[74]</sup>。以上研究表明, 外泌体蛋白质作为生物标志物在 LTBI 诊断中具有重要的临床价值, 这有助于 ATB 和 LTBI 的鉴定, 以及疾病发展程度的评估。外泌体蛋白质在结核分枝杆菌感染过程中与疾病进程中发挥不同的功能, 因而有望成为辅助诊断结核病的一种新型生物标志物。

## 5 结语与展望

综上所述, 外泌体在结核病的诊断、预后判断等方面展现出广泛的临床应用前景。虽然外泌体的基础研究取得了突破性进展, 但其距离真正的临床应用仍有较大的空间。目前, 结核分枝杆菌感染相关的外泌体研究多局限在外泌体的成分作为标志物应用于结核病的诊断, 外泌体作为标志物用于结核病诊断的临床相关数据仍缺乏, 最为重要的是外泌体成分参与体内免疫的具体机制仍

需深入研究。此外, 由于外泌体提取与纯化方法的限制, 较高纯度外泌体的获取仍然是临床大规模诊断应用的技术难题, 解决这些问题需大量的临床试验及基础技术和设备的重要突破与创新。当然, 不可否认, 外泌体作为结核病潜在的诊断和预后标志物拥有广阔的前景。

## 参考文献(References):

- [1] BAGCCHI S. WHO's global tuberculosis report 2022[J]. *Lancet Microbe*, 2023, 4(1): e20.
- [2] MANYELO C M, SOLOMONS R S, WALZL G, *et al.* Tuberculous meningitis: pathogenesis, immune responses, diagnostic challenges, and the potential of biomarker-based approaches[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(3): e01771-20.
- [3] BUSSI C, GUTIERREZ M G. *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and time[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(4): 341-361.
- [4] RAVESLOOT-CHÁVEZ M M, VAN DIS E, STANLEY S A. The innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Annual Review of Immunology*, 2021, 39: 611-637.
- [5] SIA J K, RENGARAJAN J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(4): 10.
- [6] ELKINGTON P, POLAK M E, REICHMANN M T, *et al.* Understanding the tuberculosis granuloma: the matrix revolutions[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2022, 28(2): 143-154.
- [7] CHAI Q Y, ZHANG Y, LIU C H. *Mycobacterium tuberculosis*: an adaptable pathogen associated with multiple human diseases[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 158.
- [8] ZHAI W J, WU F J, ZHANG Y Y, *et al.* The immune escape mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(2): 340.
- [9] 唐佩军, 吴妹英. 结核分枝杆菌感染免疫应答与免疫逃逸机制的研究进展[C]//《中国防痨杂志》期刊社, 中国人民解放军总医院第八医学中心全军结核病研究所, 中国医疗保健国际交流促进会结核病防治分会基础与临床学组. 全国结核病诊疗与防控暨第四届中西医结合治疗基础与临床新进展研讨会、中国医疗保健国际交流促进会结核病防治分会基础与临床专业第四届学术年会资料汇编. 北京: 中国防痨协会(TANG Peijun, WU Meiyang. Research progress on immune response and immune escape mechanism in *Mycobacterium tuberculosis* infection[C]//Chinese Journal of Tuberculosis Prevention Journal, PLA Tuberculosis Research Institute of the Eighth Medical Center of the PLA General Hospital, Basic and Clinical Group of Tuberculosis Prevention Branch of China Association for International Exchange and Promotion of Health Care. National Tuberculosis Diagnosis, Treatment, Prevention and Control and the Fourth Symposium on Basic and Clinical Progress

- of Integrated Traditional and Western Medicine Treatment, and the Fourth Annual Academic Conference of Basic and Clinical Disciplines of Tuberculosis Prevention and Control Branch of China Association for the Promotion of International Exchange of Medical Care. Beijing: Chinese Antituberculosis Association), 2019: 105–110.
- [10] QUIGLEY J, HUGHITT V K, VELIKOVSKY C A, *et al.* The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *mBio*, 2017, 8(2): e00148–17.
- [11] RAHLWES K C, DIAS B R S, CAMPOS P C, *et al.* Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Virulence*, 2023, 14(1): 2150449.
- [12] BOOM W H, SCHAIBLE U E, ACHKAR J M. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2021, 131(3): e136222.
- [13] LIEBENBERG D, GORDHAN B G, KANA B D. Drug resistant tuberculosis: implications for transmission, diagnosis, and disease management[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 943545.
- [14] ACHARYA B, ACHARYA A, GAUTAM S, *et al.* Advances in diagnosis of tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(5): 4065–4075.
- [15] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [16] GURUNG S, PEROCHEAU D, TOURAMANIDOU L, *et al.* The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2021, 19: 47.
- [17] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88: 487–514.
- [18] GURUNATHAN S, KANG M H, KIM J H. A comprehensive review on factors influences biogenesis, functions, therapeutic and clinical implications of exosomes[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16: 1281–1312.
- [19] AN Y, LIN S Y, TAN X J, *et al.* Exosomes from adipose-derived stem cells and application to skin wound healing[J]. *Cell Proliferation*, 2021, 54(3): e12993.
- [20] HESSVIK N P, LLORENTE A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(2): 193–208.
- [21] CHENG Y, SCHOREY J S. Extracellular vesicles deliver *Mycobacterium* RNA to promote host immunity and bacterial killing[J]. *EMBO Reports*, 2019, 20(3): e46613.
- [22] BHATNAGAR S, SCHOREY J S. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(35): 25779–25789.
- [23] SINGH P P, SMITH V L, KARAKOUSIS P C, *et al.* Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 189(2): 777–785.
- [24] LIU M, WANG Z G, REN S L, *et al.* Exosomes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected MSCs induce a pro-inflammatory response of macrophages[J]. *Aging*, 2021, 13(8): 11595–11609.
- [25] 郭媛媛, 尤学红, 丁学华, 等. 上皮细胞来源的外泌体通过 TLR/MyD88 信号通路促进 BCG 诱导的巨噬细胞的炎症反应[J]. *免疫学杂志*(GUO Yuanyuan, YOU Xuehong, DING Xuehua, *et al.* Epithelium-derived exosomes enhance BCG-induced inflammation in macrophages by TLR/MyD88 signaling[J]. *Immunological Journal*), 2020, 36(3): 229–234.
- [26] SMITH V L, CHENG Y, BRYANT B R, *et al.* Exosomes function in antigen presentation during an *in vivo* *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43578.
- [27] ANDRÉ F, CHAPUT N, SCHARTZ N E, *et al.* Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I /peptide complexes to dendritic cells[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 172(4): 2126–2136.
- [28] RAMACHANDRA L, QU Y, WANG Y, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(12): 5116–5125.
- [29] 唐晓磊, 胡锋, 夏先如, 等. ManLAM 结合 TLR2 激活肥大细胞释放外泌体诱导巨噬细胞向 M2 型极化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*(TANG Xiaolei, HU Feng, XIA Xianru, *et al.* Mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM) binding TLR2 activates mast cells to release exosomes and induces M2 polarization of macrophages[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 2021, 37(6): 481–486.
- [30] SINGH P P, LEMAIRE C, TAN J C, *et al.* Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN- $\gamma$  mediated activation of naïve macrophages[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18564.
- [31] SUN Z Q, SHI K, YANG S X, *et al.* Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. *Molecular Cancer*, 2018, 17: 147.
- [32] NAHAND J S, MAHJOUBIN-TEHRAN M, MOGHOOFEI M, *et al.* Exosomal miRNAs: novel players in viral infection[J]. *Epigenomics*, 2020, 12(4): 353–370.
- [33] YU X J, ODENTHAL M, FRIES J W U. Exosomes as miRNA carriers: formation–function–future[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(12): 2028.
- [34] ZHANG J, LI S, LI L, *et al.* Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2015, 13(1): 17–24.
- [35] ZHANG D F, YI Z J, FU Y R. Downregulation of miR-20b-5p facilitates *Mycobacterium tuberculosis* survival in RAW 264.7 macrophages via attenuating the cell apoptosis by Mcl-1 upregulation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(4): 5889–5896.
- [36] YUAN Q L, CHEN H T, YANG Y X, *et al.* miR-18a promotes *Mycobacterium* survival in macrophages via inhibiting autophagy by down-regulation of ATM[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(2): 2004–2012.
- [37] 吴托雅, 石金, 郭继东, 等. miR-21-3p 调节结核分枝杆菌在宿主巨噬细胞内存活机制的研究[J]. *中国防务杂志*(WU Tuoya, SHI Jin, GUO Jidong, *et al.* Mechanism of miR-21-3p modulating the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophage[J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*), 2021, 43(5): 475–481.
- [38] MOHR A M, MOTT J L. Overview of microRNA biology[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2015, 35(1): 3–11.
- [39] KAUSHIK A C, WU Q Q, LIN L, *et al.* Exosomal ncRNAs profiling of mycobacterial infection identified miRNA-185-5p as a novel biomarker for tuberculosis[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2021, 22(6): bbab210.
- [40] 冯真, 张博, 邓思齐, 等. 血浆外泌体 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 在结核病中的表达及诊断价值[J]. *安徽医科大学学报*(FENG Zhen, ZHANG Bo, DENG Siqi, *et al.* Expression and diagnostic value of plasma exosomes miR-26a-5p and miR-151a-3p in tuberculosis[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*), 2022, 57(12): 1979–1984.
- [41] ALIPOOR S D, TABARSI P, VARAHRAM M, *et al.* Serum exosomal miRNAs are associated with active pulmonary tuberculosis[J]. *Disease Markers*, 2019, 2019: 1907426.
- [42] LYU L N, ZHANG X L, LI C D, *et al.* Small RNA profiles of serum exosomes derived from individuals with latent and active tuberculosis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1174.
- [43] LIN J, WANG Y, ZOU Y Q, *et al.* Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(12): 15835–15845.

- [44] ZHANG X D, BAO L L, YU G H, *et al.* Exosomal miRNA-profiling of pleural effusion in lung adenocarcinoma and tuberculosis[J]. *Frontiers in Surgery*, 2023, 9: 1050242.
- [45] 尹慧敏, 贾永林, 李燕飞, 等. 结核性脑膜炎患者脑脊液外泌体中 let-7d 表达的研究[J]. 中国实用神经疾病杂志(YIN Hui-min, JIA Yonglin, LI Yanfei, *et al.* Study of the expression of let-7d from cerebrospinal fluid exosomes in patients with tuberculous meningitis[J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*), 2017, 20(6): 9-12.
- [46] WANG N, YAO Y L, QIAN Y F, *et al.* Cargoes of exosomes function as potential biomarkers for *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1254347.
- [47] 刘旭庆, 高宇帮, 赵良真, 等. 环状 RNA 的产生、研究方法及其功能[J]. 遗传(LIU Xuqing, GAO Yubang, ZHAO Liangzhen, *et al.* Biogenesis, research methods, and functions of circular RNAs[J]. *Hereditas (Beijing)*), 2019, 41(6): 469-485.
- [48] ZANG J K, LU D, XU A D. The interaction of circRNAs and RNA binding proteins: an important part of circRNA maintenance and function[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2020, 98(1): 87-97.
- [49] YAO T, CHEN Q Q, FU L Y, *et al.* Circular RNAs: biogenesis, properties, roles, and their relationships with liver diseases[J]. *Hepatology Research*, 2017, 47(6): 497-504.
- [50] SHI X F, WANG B, FENG X R, *et al.* circRNAs and exosomes: a mysterious frontier for human cancer[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2020, 19: 384-392.
- [51] WANG J J, LI Y J, WANG N, *et al.* Functions of exosomal non-coding RNAs to the infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1127214.
- [52] ZHANG X L, ZHANG Q, WU Q G, *et al.* Integrated analyses reveal hsa\_circ\_0028883 as a diagnostic biomarker in active tuberculosis[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2020, 83: 104323.
- [53] HUANG Z K, YAO F Y, XU J Q, *et al.* Microarray expression profile of circular RNAs in peripheral blood mononuclear cells from active tuberculosis patients[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 45(3): 1230-1240.
- [54] LIU H J, LU G, WANG W X, *et al.* A panel of circRNAs in the serum serves as biomarkers for *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1215.
- [55] LI Y, ZHENG Q P, BAO C Y, *et al.* Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. *Cell Research*, 2015, 25(8): 981-984.
- [56] GUO X, TAN W, WANG C. The emerging roles of exosomal circRNAs in diseases[J]. *Clinical & Translational Oncology*, 2021, 23(6): 1020-1033.
- [57] 盛钢, 褚洪迁, 刘丁一, 等. 临床标本中结核分枝杆菌抗原蛋白鉴定的研究进展[J]. 中国防痨杂志(SHENG Gang, CHU Hong-qian, LIU Dingyi, *et al.* Progress in the identification of *Mycobacterium tuberculosis* antigenic proteins in clinical specimens[J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*), 2022, 44(12): 1363-1368.
- [58] KRUIH-GARCIA N A, WOLFE L M, CHAISSON L H, *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103811.
- [59] 黄佳玲, 刘沫然, 田海容, 等. 结核杆菌 Ag85B 蛋白的表达及免疫特性的试验研究[J]. 中国地方病防治杂志(HUANG Jialing, LIU Moran, TIAN Hairong, *et al.* Experimental study on the expression and immunological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B protein[J]. *Chinese Journal of Control of Endemic Diseases*), 2016, 31(10): 1168, 1189.
- [60] 陈浩天, 付玉荣, 伊正君. 结核分枝杆菌 GLCB 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志(CHENG Haotian, FU Yurong, YI Zhengjun. Bioinformatics analysis of *Mycobacterium tuberculosis* protein GLCB[J]. *Journal of Pathogen Biology*), 2020, 15(5): 512-517.
- [61] SILVA B D S, TANNUS-SILVA D G S, RABAHI M F, *et al.* The use of *Mycobacterium tuberculosis* HspX and GlcB proteins to identify latent tuberculosis in rheumatoid arthritis patients[J]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2014, 109(1): 29-37.
- [62] SINGH S, MAURYA S K, AQDAS M, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* exploits MPT64 to generate myeloid-derived suppressor cells to evade the immune system[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(11): 567.
- [63] 屈蓉, 吴康, 吴娟, 等. 结核分枝杆菌早期分泌蛋白 MPT64 的原核表达及其在结核病血清学诊断上的初步应用[J]. 中国生物制品学杂志(QU Rong, WU Kang, WU Juan, *et al.* Prokaryotic expression of early secretory protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* and its application in serological diagnosis of tuberculosis[J]. *Chinese Journal of Biologicals*), 2021, 34(5): 566-570.
- [64] 徐芳, 张万江. 结核分枝杆菌小分子热休克蛋白 Hsp16.3 功能及与结核病的关系研究进展[J]. 中国病原生物学杂志(XU Fang, ZHANG Wanjiang. Advances in the study of the relationship between the function of *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein 16.3 and tuberculosis[J]. *Journal of Pathogen Biology*), 2011, 6(10): 776-778, 764.
- [65] YANG L, ZHANG C Q, ZHAO Y, *et al.* Effects of *Mycobacterium tuberculosis* mutant strain Hsp16.3 gene on murine RAW 264.7 macrophage autophagy[J]. *DNA and Cell Biology*, 2018, 37(1): 7-14.
- [66] ZHANG Y H, LI S S, LIU Q Y, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* heat-shock protein 16.3 induces macrophage M2 polarization through CCRL2/CX3CR1[J]. *Inflammation*, 2020, 43(2): 487-506.
- [67] ZHANG C Q, SONG X Q, ZHAO Y, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* secreted proteins as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis and latent tuberculosis infection[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2015, 29(5): 375-382.
- [68] HUANG C, PAN L P, SHEN X L, *et al.* Hsp16.3 of *Mycobacterium tuberculosis* in exosomes as a biomarker of tuberculosis[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2021, 40(11): 2427-2430.
- [69] SHEKHAWAT S D, PUROHIT H J, TAORI G M, *et al.* Evaluation of heat shock proteins for discriminating between latent tuberculosis infection and active tuberculosis: a preliminary report[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2016, 9(2): 143-152.
- [70] DIAZ G, WOLFE L M, KRUIH-GARCIA N A, *et al.* Changes in the membrane-associated proteins of exosomes released from human macrophages after *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37975.
- [71] 李焯, 刘佳星, 岳莉, 等. 热休克蛋白 90 $\alpha$  在活动性肺结核患者血液中的表达研究[J]. 大医生(LI Ye, LIU Jiaxing, YUE Li, *et al.* Study on the expression of heat shock protein 90 $\alpha$  in the blood of patients with active pulmonary tuberculosis[J]. *Doctor*), 2022, 7(20): 13-16.
- [72] ZHANG M, XIE Y P, LI S S, *et al.* Proteomics analysis of exosomes from patients with active tuberculosis reveals infection profiles and potential biomarkers[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 800807.
- [73] MEHAFFY C, KRUIH-GARCIA N A, GRAHAM B, *et al.* Identification of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in serum extracellular vesicles from persons with latent tuberculosis infection[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(6): e00393-20.
- [74] DU Y, XIN H N, CAO X F, *et al.* Association between plasma exosomes S100A9/C4BPA and latent tuberculosis infection treatment: proteomic analysis based on a randomized controlled study[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 934716.